ПАРАЗИТОЛОГИЯ, 52, 6, 2018

УДК 576.895.122 DOI: 10.1134/S0031184718060029

ВИДОВАЯ ИДЕНТИФИКАЦИЯ СПОРОЦИСТ *LEUCOCHLORIDIUM PARADOXUM* (TREMATODA)

© Е. Е. Прохорова, А. А. Виноградова, А. С. Токмакова, Г. Л. Атаев*

РГПУ им. А. И. Герцена, кафедра зоологии
наб. р. Мойки, 48, С.-Петербург, 191186
* E-mail: ataev@herzen.spb.ru

Поступила 10.04.2018

В ходе экспериментального заражения цыплят метацеркариями рода *Leucochloridium* получены мариты, строение которых соответствует *L. paradoxum*. Видовая идентификация по морфологическим признакам подтверждена также результатами генотипирования метацеркарий и марит по рДНК. Полученные данные доказывают правомерность определения спороцист *L. paradoxum* по форме и зеленой окраске их отростков.

Ключевые слова: трематоды, экспериментальное заражение, *Leucochloridium paradoxum*, *Succinea putris*, генотипирование, мариты, спороцисты.

Особенностью видовой идентификации трематод является наличие двух систем — одна разработана для марит, другая для их личинок — церкарий. На обеих стадиях развития паразиты имеют характерные морфологические признаки, которые позволяют их идентифицировать с большей или меньшей достоверностью. Соответственно выпущены определители и обзорные статьи, в которых используется либо одна, либо другая классификация. К сожалению, видовые названия трематод в разных системах часто не совпадают, что объясняется недостатком знаний об их жизненных циклах. Применение методов генотипирования в последнее время упростило задачу согласования разных систем.

Среди трематод есть немногие виды, для которых определение вида формально осуществляется по особям партеногенетического поколения — редиям или спороцистам. Наиболее известный пример — спороцисты рода *Leucochloridium*. У этих сосальщиков отсутствуют церкарии, а заражение дефинитивного хозяина (разнообразные птицы) происходит при поедании им метацеркарий, которые развиваются уже в отростках спороцист, обладающих у разных видов различной формой и окраской (Woodhead, 1935; Bakke, 1978; Pojmanska, 1962; Гинецинская, 1968). Объективность использования морфологических признаков спороцист для определения вида внутри рода *Leucochloridium* была подтверждена молекулярно-генетическими методами (Casey et al., 2003).

На протяжении многих лет партениты рода *Leucochloridium* являются объектами нашего исследования. В том числе спороцисты изучались для уточнения их систематического положения как по морфологическим, так и по молекулярно-генетическим признакам. В частности, по фрагменту рДНК были генотипированы спороцисты с зелеными отростками (предположительно *L. paradoxum*) из нескольких регионов европейской части России (Атаев и др., 2013; Ataev et al., 2013; Ataev et al., 2016). Однако окончательное решение вопроса о таксономической принадлежности вида можно сделать только после получения сведений о фазе жизненного цикла, представленной в определительных таблицах (в данном случае марит). Генотипирование марит *L. paradoxum* ранее никем не проводилось. С целью получения марит были экспериментально заражены цыплята метацеркариями из спороцист с зелеными отростками (предположительно *L. paradoxum*), извлеченных из моллюсков *Succinea putris*.

Особенностью нашего исследования стал комплексный анализ видовой принадлежности изучаемых трематод как по морфологическим, так и по молекулярно-генетическим признакам.

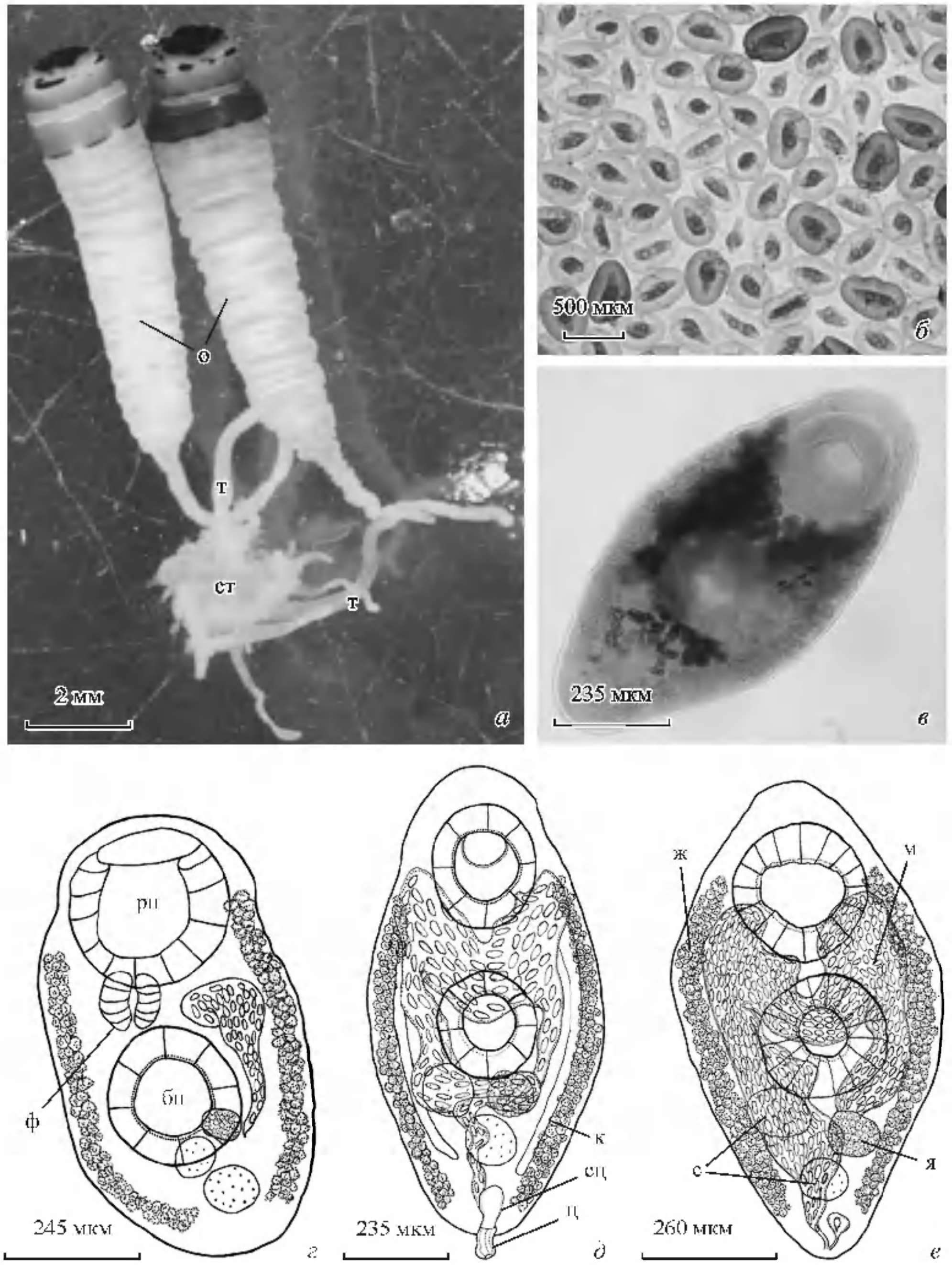
МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Моллюски *Succinea putris* L. 1758, зараженные спороцистами *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835 были собраны в июле 2018 г. на территории биостанции РГПУ им. А. И. Герцена, расположенной в районе пос. Вырица Ленинградской обл. (59° 24′ 40″ с. ш., 30° 20′ 50″ в. д.). Из зрелых отростков спороцист (окрашенных в зеленый цвет) были извлечены метацеркарии (см. рисунок, *а*, *б*).

Для заражения были использованы цыплята породы Суссекс. Для их выведения в инкубатор (+ 39 °C) было помещено 10 яиц. В течение первых 18 дней влажность поддерживалась на уровне 50 %, а затем — 90 %. На 22-й день инкубирования вылупились 3 цыпленка. До заражения они не питались. В дальнейшем в течение первой недели их кормили обезжиренным творогом и вареным пшеном, а затем пшеном и сушеным салатом.

Заражение цыплят проводилось через 6—8 ч после их вылупления с помощью микродозатора. Доза заражения составляла 30—35 метацеркарий на цыпленка. Вскрытие цыплят проводилось через 8, 14 и 21 сут после заражения. Соответственно у них было обнаружено в клоаке 5, 4 и 3 мариты. Строение последних изучалось на препаратах, окрашенных кармином. Рисунки выполнены с помощью рисовального аппарата на микроскопе Leica DM 1000. Микрофотографии спороцист, метацеркарий и марит выполнены на микроскопе Leica DM 5000.

Часть метацеркарий из спороцисты, использованной для заражения, а также часть выращенных в цыплятах марит были генотипированы по фрагменту рДНК, включающему полные нуклеотидные последовательности первого и второго внутренних транскрибируемых спейсеров (ITS1 и ITS2) и гена 5.8S рРНК, а также частичные последовательности генов 18S и 28S рРНК. Для генотипирования были использованы образцы хромосом-



Морфология спроцист и марит трематод *Leucochloridium paradoxum*.

а — спороциста *Leucochloridium paradoxum*; *б* — метацеркарии *Leucochloridium paradoxum*; *в* — микрофотография 14-дневной мариты; *г*—*е* рисунки марит через: 9 дней (*г*), 14 дней (*д*), 22 дня (*е*) после заражения. бп — брюшная присоска, ж — желточник, к — кишка, м — матка, о — отростки, рп — ротовая присоска, с — семенник, ст — столон, сц — сумка цирруса, т — трубчатые части спороцисты, ф — фаринкс, ц — циррус, я — яичник.

Morphology of the sporocyst and adults of trematodes *Leucochloridium paradoxum*.

Размеры марит трематод *Leucochloridium paradoxum* по данным разных авторов

Comparative sizes of adults *Leucochloridium paradoxum* according to different authors

Размеры марит, мкм	Собственные данные (21 день пз*)	По: Carus, 1835	По: Pojmanska, 1963 (20 дней пз)	По: Pojmanska, 1967, 1969	По: Rzad et al., 2014	По: Heneberg et al., 2016
Тело	1400 × 825	1520 ± 206 × 875 ± 89 (1143—1886 × 700—1000)	1500 × 900	1510—1900 × 980—1270	1111 ± 195 × 591 ± 71 (909—1709 × 438—775)	1520 ± 206 × 875 ± 89 (1143—1886 × 700—1000)
Ротовая присоска	430 × 420	405 ± 53 × 481 ± 41 (307—493 × 396—596)	500 × 420	440—540 × 510—630	331 ± 39 × 357 ± 17 (257—379 × 331—399)	405 ± 53 × 481 ± 41 (307—493 × 396—596)
Брюшная присоска	375 × 390	403 ± 51 × 441 ± 40 (294—493 × 365—510)	450 × 450	—	296 ± 39 × 294 ± 32 (236—348 × 246—344)	403 ± 51 × 441 ± 40 (294—493 × 365—510)
Соотношение присосок ротовая: брюшная (длина × ширина)	1.15 : 1 × 1.08 : 1	1 ± 0.1 × 0.9 ± 0.1 (1 : 0.9—1.3 × 1 : 0.8—1)	—	1 : 1.13	1.11 : 1 × 1.24 : 1 (1.2 : 1)	1 ± 0.1 × 0.9 ± 0.1 (1 : 0.9—1.3 × 1 : 0.8—1)
Фаринкс	120 × 115	130 ± 20 × 164 ± 27 (102—174 × 116 —203)	140 × 180	160—200 × 170—270	—	130 ± 20 × 164 ± 27 (102—174 × 116—203)
Циррус	150	187 ± 34 × 61 ± 2 (147—230 × 56—64)	190 × 140	—	—	187 ± 34 × 61 ± 2 (147—230 × 56—64)
Яичник	135 × 130	135 ± 31 × 167 ± 28 (87—203 × 110—220)	140 × 140	150—200 × 200—270		135 ± 31 × 167 ± 28 (87—203 × 110—220)

Продолжение таблицы

Размеры марит, мкм	Собственные данные (21 день пз*)	По: Carus, 1835	По: Pojmanska, 1963 (20 дней пз)	По: Pojmanska, 1967, 1969	По: Rzad et al., 2014	По: Heneberg et al., 2016
Семенник верхний (задний)	165 × 160	166 ± 34 × 186 ± 42 (87—230 × 104—244)	180 × 180	140—200 × 190—210	—	166 ± 34 × 186 ± 42 (87—230 × 104—244)
Семенник нижний (передний)	190 × 180	177 ± 38 × 202 ± 39 (116—261 × 116—290)	180 × 160	150—200 × 200—270	—	177 ± 38 × 202 ± 39 (116—261 × 116—290)

Примечание. * пз — дней после заражения.

ной ДНК, выделенные из отдельных метацеркарий и марит. ПЦР и анализ ПЦР-продкутов осуществлялись с использованием ранее описанной методики (Zhukova et al., 2014).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе экспериментального заражения цыплят нами были получены мариты разных возрастов: 1, 2, и 3 недели (см. рисунок, *в—е*). Морфометрия червей возраста 21 сут соответствует показателям марит *L. paradoxum* (см. таблицу). Это касается и размеров тела, и диаметра присосок, которые у данного вида меньше, чем у других представителей рода *Leucochloridium* (*L. perturbatum*, *L. vogtianum*) (Pojmanska, 1967; Bakke, 1980; Rzad et al., 2013, и др.). Важно отметить, что размерные характеристики марит *L. paradoxum* как из природных, так и из экспериментальных заражений в работах разных авторов заметно варьируют (Carus, 1835; Pojmanska, 1963, 1967; Rzad et al., 2014; Heneberg et al., 2016). В частности, это явление объясняется особенностями развития данных трематод в разных видах птиц (см. таблицу). Для марит *L. paradoxum* характерна округлая форма, тогда как другие виды обладают овальным или вытянутым телом.

Более надежными видовыми признаками для марит этого рода считаются особенности строения половой системы. Выращенные в эксперименте особи имеют характерные именно для *L. paradoxum* (см. рисунок, *в*, *е*): матку, образующую одну петлю, проходящую перед брюшной присоской; половые железы, в совокупности составляющие треугольник вблизи брюшной присоски. Желточники заходят за ветви кишечника и тянутся до бурсы цирруса; бурса и циррус хорошо развиты (см. рисунок, *г—е*). Однако наиболее характерными морфологическими особенностями *L. paradoxum*, на наш взгляд, являются следующие: 1 — только у этого вида матка не выходит из межкишечного пространства и 2 — матка достигает середины ротовой присоски.

Ранее разными авторами неоднократно предпринималась попытка экспериментального заражения различных птиц метацеркариями *L. paradoxum*. В частности, успешно заражались воробьи, дрозды (Pojmanska, 1963, 1967), сизая чайка и зебровые амадины (Bakke, 1976, 1980). В результате была подтверждена широкая специфичность этих трематод к дефинитивному хозяину. Во всех случаях удавалось получать мариты типичного для этого вида строения, которые, однако, различались по морфометрическим показателям в зависимости от хозяина, в котором развивались. Эта же корреляция отмечалась и для природных инвазий. В частности, на нее обратили внимание Быховская-Павловская (1951) и Пойманская (Pojmanska, 1967). Тем не менее мариты, выращенные нами в цыплятах, соответствуют по своим морфометрическим характеристикам *L. paradoxum*.

Как уже отмечалось, у трематод данного вида ранее были генотипированы только спороцисты. Для проведения молекулярно-генетического анализа из отдельных марит, полученных на разных сроках заражения, была выделена ДНК. По результатам генотипирования метацеркарий из спороцист, а также разновозрастных марит, извлеченных из цыплят, были получены нуклеотидные последовательности фрагментов рДНК, протяженностью по 1308 нуклеотидов (GenBank: MH101511). Все полученные фрагменты рДНК по результатам выравнивания оказались идентичны между собой и с ранее полученными нуклеотидными последовательностями рДНК спороцист *L. paradoxum* из Ленинградской обл. (GenBank: KP938187.1).

Таким образом, в ходе изучения спороцист из моллюсков *Succinea putris* и марит, экспериментально выращенных в цыплятах установлено, что они относятся к одному виду — *L. paradoxum*. Также подтверждена возможность использования морфологических признаков спороцист (формы и окраски отростков) для видовой идентификации трематод этого вида (Ataev et al., 2016).

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке грантов РФФИ № 16-04-00793 и 18-34-00522 мол_а.

Список литературы

Атаев Г. Л., Добровольский А. А., Токмакова А. С. 2013. Размножение партенит трематод *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Leucochloridiidae). Паразитология. 47 (2): 178—182.

Быховская-Павловская И. Е. 1951. Изменчивость морфологических признаков и ее значение в систематике рода *Leucochloridium* Carus, 1835. Паразитологический сборник. 13. М.; Л.: Изд-тво АН СССР. 45—74.

Гинецинская Т. А. 1968. Трематоды, их жизненные циклы, биология и эволюция. Л.: Наука. 411 с.

Ataev G. L., Babich P. S., Tokmakova A. S. 2013. Study of the sporocyst broodsacs coloring of *Leucochloridium paradoxum* (Trematoda: Brachylaemidae). Паразитология. 47 (5): 372—379.

Ataev G. L., Zhukova A. A., Tokmakova A. S., Prokhorova E. E. 2016. Multiple infection of amber snails *Succinea putris* with sporocysts of *Leucochloridium* spp. (Trematoda). Parasitology Research. 115 (8): 3203—3208.

Bakke T. A. 1976. Shape, size and surface topography of genital organs of *Leucochloridiun* sp. (Digenea), revealed by light and scanning electron microscopy. Zeitschrift fur Parasitenkunde. 51 (1): 99—113.

Bakke T. A. 1978. Intraspecific variation of adult *Leucochloridium* sp. (Digenea) from natural and experimental infections. Canadian Journal of Zoology. 56 (1): 94—102.

Bakke T. A. 1980. A revision of the family Leucochloridiidae Poche (Digenea) and studies on the morphology of *Leucochloridium paradoxum* Carus, 1835. Systematic Parasitology. 1 (3/4): 189—202.

Carus C. 1835. Beobachtungen über einen merkwürdigen Schöngefärbten Eingeweidewurm *Leucochloridium paradoxum* mihi und dessen parasitishe Erzeugung in einer Landschnecke *Succinea amphibia* Drap., Helix putris Z. Nova Acta Academiae Caesareae Leopoldino-Carolinae Germanicae Naturae Curiosorum. 17 (1): 85—100.

Casey S. P., Bakke T. A., Harris P. D., Cable J. 2003. Use of ITS rDNA for discrimination of European green- and brown-banded sporocysts within the genus *Leucochloridium* Carus, 1835 (Digenea: Leucochloriidae). Systematic Parasitology. 56 (3): 163—168.

Heneberg P., Sitko J., Bizos J. 2016. Molecular and comparative morphological analysis of central European parasitic flatworms of the superfamily Brachylaimoidea Allison, 1943 (Trematoda: Plagiorchiida). Parasitology. 143 (4): 455—474.

Pojmanska T. 1962. On sporocysts of the genus *Leucochloridium* Carus in Poland. Acta Parasitologica Polonica. 10: 369—376.

Pojmanska T. 1963. Experimental development of *Leucochloridium* sp. (Trematoda, Brachylaemidae). Acta Parasitologica Polonica. 11: 153—159.

Pojmanska T. 1967. Variability of *Leucochloridium paradoxum* Carus (=*L. heckerti* Kagan, 1952) (Trematoda: Brachylaimidae) in natural and experimental conditions. Acta Parasitologica Polonica. 14: 381—398.

Rzad I., Hofsoe P., Panicz R., Nowakowski J. K. 2014. Morphological and molecular characterization of adult worms of Leucochloridium paradoxum Carus, 1835 and *L. perturbatum* Pojmanska, 1969 (Digenea: Leucochloridiidae) from the great tit, *Parus major* L., 1758 and similarity with the sporocyst stages. Journal of Helminthology. 88 (4): 506—510.

Woodhead E. 1935. The mother sporocysts of *Leucochloridium*. The Journal of Parasitology. 21 (5): 337—346.

Zhukova A. A., Prokhorova E. E., Tokmakova A. S., Tsymbalenko N. V., Ataev G. L. 2014. Identification of species *Leucochloridium paradoxum* and *L. perturbatum* (Trematoda) based on rDNA sequences. Паразитология. 48 (3): 185—192.

SPECIES IDENTIFICATION OF *LEUCOCHLORIDIUM PARADOXUM* (TREMATODA) SPOROCYSTS

E. E. Prokhorova, A. A. Vinogradova, A. S. Tokmakova, G. L. Ataev

Key words: trematodes, experimental infection, *Leucochloridium paradoxum*, *Succinea putris*, genotyping, adults, sporocysts.

SUMMARY

During experimental infestation of newborn chickens with metacercariae of *Leucochloridium sp.*, the obtained adults possessed the structure similar to that typical of the species *L. paradoxum*. Species identification by morphological characters was also confirmed by the results of rDNA genotyping of metacercariae and adults. Our data prove the appropriateness of determination of *L. paradoxum* sporocysts by their shape and the color of their broodsacks.